

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Petra Mazur, apsolvant

Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

**UČINKOVITOST ENTOMOPATOGENIH NEMATODA (*Heterorhabditis
bacteriophora*) U SUZBIJANJU KESTENJASTOG BRAŠNARA (*Tribolium
castaneum*)**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Petra Mazur, apsolvent

Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

UČINKOVITOST ENTOMOPATOGENIH NEMATODA (*Heterorhabditis
bacteriophora*) U SUZBIJANJU KESTENJASTOG BRAŠNARA (*Tribolium
castaneum*)

DIPLOMSKI RAD

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Anita Liška, predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Ivana Majić, mentor
3. doc. dr. sc. Ankica Sarajlić, član

Osijek, 2018.

Zahvala

Na ovoj stranici voljela bih izraziti riječi zahvale svima onima koji su mi omogućili da danas budem tu gdje jesam i budem to što jesam.

Na prvom mjestu želim zahvaliti svojoj dragoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Majić koja mi je pružila izvanrednu priliku i zadovoljstvo svojim prijedlogom za ovaj rad i temu te na svim njezinim sugestijama, smjernicama, znanju i trudu, opremi kao i na njezinom strpljenju i odgovorima na sva moja pitanja. Velika mi je čast i hvala na posvećenom vremenu. Puno sam naučila od Vas.

Posebnu zahvalu dala bih čovjeku svog života, Antoniu, koji me tijekom svih godina studija volio, bodrio, podržavao i vjerovao u mene kada ni sama nisam vjerovala. Kada bi u ljubavi postojao račun, uvijek bih ti dugovala. Hvala na bezgraničnoj ljubavi koju mi pružaš u svemu. Bez tebe ne bi bilo ovog rada ni mojih uspjeha.

Također, hvala mojim roditeljima na strpljenju, ljubavi, podršci, usmjeravanju i ljubavi prema prirodi i okolišu. Najviše hvala mom tati koji se ponosi do suza.

Hvala mojoj kumi Ana-Mariji. Ti si ta koja je uvijek bezuvjetno bila tu i vjerovala, nadala se, bodrila, pitala, pomagala i uz koju rastem kao osoba od prvog dana srednje škole. Imajući tebe, znam da sam i ja dobra osoba. Volim što si tu.

Mojim prijateljicama, Donni, Maji, Rei i Pameli. Hvala za prijateljstvo, podršku, zabavu i smijeh koji je uvijek olakšavao sve ovo. Zauvijek ste u mom srcu.

Mojoj teti Diani hvala za svaki savjet i moralnu podršku tijekom svih godina studija. Hvala što vjeruješ u mene, što navijaš za mene i što si uvijek tu.

Učiteljici Sanji Lamza zahvaljujem za svaki sat koji me pustila s posla, što je bila uz mene iako nije morala, što je stajala uz mene svojim savjetima, podrškom, ljubavlju te me prihvatila kao vlastito dijete. Hvala Vam od sveg srca.

Rad posvećujem mojim voljenima, djedi i baki koji su me usmjeravali od malih nogu i podsjećali koliko je važno učiti, a danas nisu tu da vide moj konačni uspjeh.

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	3
2.1. ENTOMOPATOGENE NEMATODE.....	3
2.1.1. <i>HETERORHABDITIS BACTERIOPHORA</i>	7
2.2. KESTENJASTI BRAŠNAR (<i>TRIBOLIUM CASTANEUM</i>).....	12
2.2.1. SUZBIJANJE <i>TRIBOLIUM CASTANEUM</i>	14
3. MATERIJALI I METODE.....	16
3.1. UZGOJ NEMATODA.....	16
3.2. UZGOJ KESTENJASTOG BRAŠNARA.....	17
3.3. UTVRĐIVANJE PATOGENOSTI ENTOMOPATOGENIH NEMATODA <i>HETERORHABDITIS BACTERIOPHORA</i>	18
3.4. ANALIZA PODATAKA.....	20
4. REZULTATI.....	21
5. RASPRAVA.....	25
6. ZAKLJUČAK.....	27
7. POPIS LITERATURE.....	28
8. SAŽETAK.....	32
9. SUMMARY.....	33
10. POPIS SLIKA.....	34
11. POPIS TABLICA.....	36
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....	37
BASIC DOCUMENTATION CARD.....	38

1. UVOD

Uz kukce i grinje, nematode su najbrojniji organizmi u carstvu Animalia (Ivezić, 2014.; Larsen i sur., 2017.). Najbrojniji su višestanični organizmi koji žive na Zemlji. Veličine su 5-200 μm te crvolikog (Slika 1) ili cistolikog oblika (Oštrec, 2001.).



Slika 1. Crvolik oblik tijela nematode (Foto: Ivana Majić, 2018.)

Žive u tlu, te slatkim i slanim vodama. Za njihov život važna je voda zato što nematode žive u tlu u filmu vode koji se nalazi oko čestice tla. Svaki cm^3 obradivog tla sadrži najčešće od 5 do 100 različitih vrsta nematoda. Nematode u tlu se dijele u trofičke grupe i s obzirom na to mogu biti: biljni paraziti, fungivori, bakterivori, saprofagi, predatori i dr. (Yeates i sur., 1993.).

Nathan Cobb, američki znanstvenik koji se smatra ocem nematologije, rekao je 1914.: "Ako bi čitava materija u svemiru nestala, izuzev nematoda, naš svijet bi i dalje bio prepoznatljiv. Ako bi se i tad mogli vratiti, i tada ga mogli istražiti i proučavati, mogli bismo pronaći njegove planine, brda, doline, rijeke, jezera i oceane po vrstama nematoda. Mogli bi se otkriti i položaji gradova, jer svako masovno postojanje i život ljudi odgovara i masovnom postojanju i životu nematoda. Drveće bi svojim redovima predstavljalo naše ulice i puteve. Položaje raznih biljaka i životinja bi još bilo moguće odrediti, a ako bi imali dovoljno znanja, u mnogim slučajevima moglo bi se i otkriti njihova vrsta, analizirajući parazitske nematode koje su na njima živjele."

Do danas su znanstvenici identificirali oko 20 000 različitih vrsta nematoda, a pretpostavljaju da na Zemlji postoji oko 80 milijuna vrsta. Morfološki ih je teško međusobno razlikovati i postoji veliki broj kriptičnih vrsta (Larsen i sur., 2017.). Kriptične vrste su one koje morfološki nalikuju jedna drugoj, ali ne razvijaju potomke, kao npr. *Pristionchus pacificus* s *P. expectatus* i *P. japonicus* (Kanzaki i sur., 2012.). Nematode također parazitiraju ljude i životinje, a neke od parazitskih vrsta su: *Enterobius vermicularis* (dječja glista, slika 2), *Trichinella spiralis* (bolest trihineloz), *Necator americanus* (rudarska glista) i dr. (Ivezić, 2014.).



Slika 2. Odrasla ženka dječje gliste (*Enterobius vermicularis*)

(izvor: <https://www.cdc.gov/dpdx/>)

Cilj ovog rada bio je testirati učinkovitost hrvatskog soja entomopatogenih nematoda *Heterorhabditis bacteriophora* u suzbijanju kestenjastog brašnara *Tribolium castaneum*.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. ENTOMOPATOGENE NEMATODE

U 17. stoljeću bilo je poznato da nematode parazitiraju kukce i to kada su Aldrovandi (1623.) i Lister (1671.) u kukcima pronašli „dugačke crve“ (Poinar, 1975.). S istraživanjem entomopatogenih nematoda krenulo se 1929. godine kada su Glaser i Fox našli ličinke japanskog pivca (*Popillia japonica*) zaražene nematodom koju je Steiner opisao kao *Neoaplectana (Steinernema) glaseri*. Od 1929. godine sve do 1960-tih, zbog porasta proizvodnje kemijskih pesticida, entomopatogene nematode su zaboravljene, da bi se nakon uočenih štetnih utjecaja pesticida na ljude i okoliš ponovno javila potreba za njihovom uporabom, proučavanjem i proizvodnjom (Lacey i Georgis, 2012.).

Entomopatogene nematode su smrtonosni paraziti kukaca. Riječ entomopatogen dolazi od grčke riječi entomon, što znači kukac i riječi patogen što znači da uzrokuje bolest. Ove nematode žive unutar tijela svog domaćina te zbog toga pripadaju grupi endoparazita. Napadaju različite vrste kukaca kao što su: pipe, listorošci, gusjenice sovice, muhe i druge štetne kukce (Poinar, 1975.; Poinar i sur.; 1987.; Kaya i sur.; 1993.; Schroeder i sur.; 1996.; Jaworska, 1998.).

Žive u raznim tipovima tala i široko su rasprostranjene na svakom kontinentu. U biološkoj kontroli štetnih kukaca najviše se koriste i proučavaju porodice Heterorhabditidae i Steinernematidae (Gaugler, 2006.; Oštrec, 2001.). Prvi pokušaj biološke borbe sa entomopatogenim nematodama bio je 1930-te godine kada su Glaser i suradnici primijenili entomopatogene nematode u suzbijanju japanskog pivca (*P. japonica*) na 73 parcele. Nakon dva tjedna na 72 parcele pronađene su ličinke kukaca koje su parazitirane nematodama. Nakon toga su odabrane četiri parcele na koje su stalno unošene ličinke pivca, a nematode su na tim parcielama ostale prisutne još 8,5 godina (Smart, 1995.). Heterorhabditidae (Slika 3) i Steinernematidae (Slika 4) su ekonomski važne porodice entomopatogenih nematoda. Njihov životni ciklus dobro je proučen, a između porodica razlika je što se kod Heterorhabditidae u prvoj generaciji razvijaju samo hermafroditi, a u drugoj generaciji ženke, mužjaci i hermafroditi, dok se kod Steinernematidae razvijaju razlučeni spolovi. Ličinke trećeg stadija (infektivne ličinke) aktivno ulaze u kuca najčešće kroz usta ili analni otvor. Kada dospiju u kukca, uđu u hemocel (Webster, 1972.) i inficiraju domaćina simbiotskim bakterijama roda *Xenorhabdus* ili *Photorhabdus* te uzrokuju smrt domaćina za 48 sati.

Kako se nematode i bakterije hrane domaćinom, on se razgrađuje i pretvara u tekućinu, a unutar njega nastaje nekoliko novih generacija nematoda. Nakon tjedan dana, kada im ponestane hrane unutar domaćina, pojavljuje se nekoliko stotina tisuća infektivnih ličinki koje u potrazi za novim domaćinom, nose sa sobom bakterije koje su primile od okruženja unutar domaćina (Boemare, 2002.; Gaugler, 2006.).



Slika 3. *Heterorhabditis bacteriophora*, vrsta iz porodice Heterorhabditidae

(Izvor: <https://shopping.agrimag.it>)

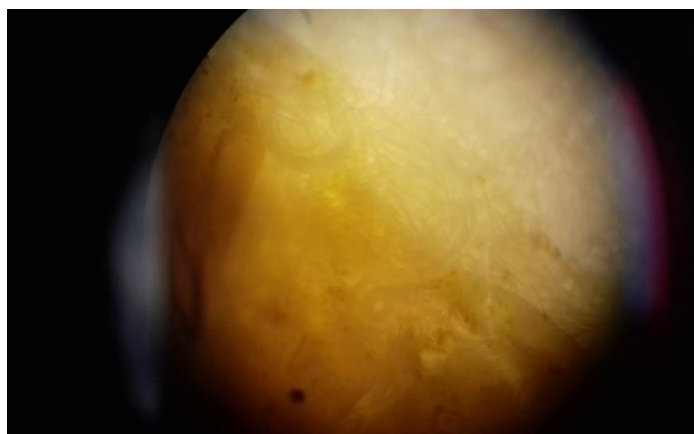


Slika 4. *Steinernema scapterisci*, vrsta iz porodice Steinernematidae

(Izvor: <https://www.forestryimages.org>)

Što se tiče pronalaska domaćina, kod entomopatogenih nematoda to varira između vrsta. Infektivne ličinke koriste različite načine za pronalazak domaćina, koje variraju od zasjede do aktivnog kruženja u pronalaženju hrane. Nematode *H. bacteriophora* kruže u potrazi za hranom i zaražavaju kukce koji žive u i na tlu. Neke *Steinernema* vrste prave zasjedu na način da dižu svoja tijela kako bi se lakše pričvrstile na kukce (Campbell i Gaugler, 1993.) ili skaču na način da formiraju petlju koju stvara pohranjena energija, koja, kada se oslobodi, tjera nematode u zrak, te izgleda kao da skaču (Campbell i Kaya, 2000.). S obzirom na različite načine pronalaska hrane, omogućena je koegzistencija obje vrste u istom staništu te im ti načini omogućuju infekciju različitih domaćina, a nematode razdvajaju u prostoru (Kaya i Koppenhöfer, 1996.). To su dokazali Millar i Barbercheck (2001.) kada su ispustili i pratili nematode *Steinernema riobrave* koje su preživjele godinu dana nakon ispuštanja. One su značajno smanjile populaciju nematoda *H. bacteriophora*, ali ih nisu istisnule. Također, *S. riobrave* nisu imale nikakav utjecaj na nematode *S. carpocapsae* što dokazuje da je moguća koegzistencija.

Budući da entomopatogene nematode u prirodnim uvjetima ne obitavaju u dovoljno visokim populacijama, one se diljem svijeta masovno uzgajaju u laboratorijima (Gaugler, 1992.). Dva su načina na koji se mogu uzgajati nematode, a to su *in vivo* tj. u kukcima – domaćinima (Slika 5) kao npr. *Steinernema* i *Heterorhabditis* vrste u ličinkama voskovog moljca (*Galleria mellonella* L.) (Nickle, 1980.) ili *in vitro* što znači na krutoj ili tekućoj podlozi (Bedding, 1976.).



Slika 5. Entomopatogene nematode vidljive ispod kutikule kukca
(Foto: Ivana Majić, 2016.)

Učinkovitost entomopatogenih nematoda ovisi o gustoći njihove populacije kao i o gustoći populacije kukaca, patogenosti nematoda, reproduktivnim sposobnostima domaćina i nematoda te o ekološkim čimebenicima (Hominick i Tingley, 1984.).

Entomopatogene nematode su biopesticidi, a u odnosu na kemijske pripravke imaju slijedeće prednosti:

- djeluju brzo i učinkovito kroz duži vremenski period;
- imaju visok potencijal razmnožavanja;
- imaju širok spektar domaćina;
- jednostavno se uzgajaju;
- nisu štetni za druge organizme niti okoliš;
- nema opasnosti od rezidua;
- primjena je jednostavna;
- nije potrebno vrijeme čekanja od sjetve ili sadnje;
- mogu se kombinirati s kemijskim pripravcima;
- pri apliciranju nije potrebna zaštitna oprema (Nickle, 1980.).

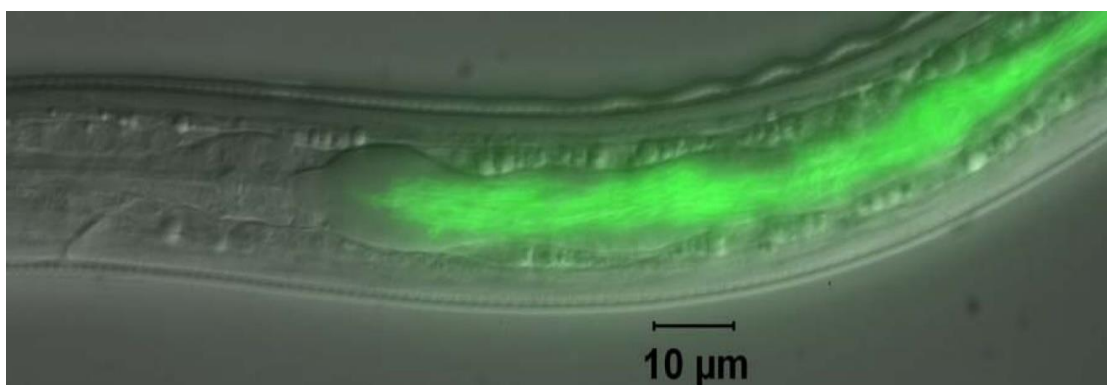
Znajući koliko su pesticidi štetni za ljude i okoliš te koliko se teško razgrađuju, uzgoj i primjena entomopatogenih nematoda kao i drugih biopesticida je u mnogim zemljama u stalnom porastu (Lacey i Georgis, 2012.). Biološka kontrola štetnih kukaca podrazumijeva uporabu prirodnih neprijatelja (u ovom slučaju nematoda) u suzbijanju štetnih kukaca.

Prirodne populacije entomopatogenih nematoda iz porodica Steinernematidae i Heterorhabditidae su svugdje prisutne, ali za njihovo učinkovitije djelovanje potrebno je izvršiti njihovu introdukciju u agroekosustavima kada se za to ukaže potreba.

Nematode u asocijacijama s kukcima, opisane su u više od 30 porodica (Stock i Hunt, 2005.). Iako su otkrivene i opisane prije 100 godina, njihova ozbiljnija primjena u kontroli štetnih kukaca započela je prije više od 30 godina. To nije bilo moguće ranije jer su bila potrebna istraživanja koja su dovela do boljeg razumijevanja ekologije nematoda, broja domaćina, procesa parazitacije kao i do napretka u području tehnologije kao što je proizvodnja, formulacija i skladištenje. Sve ovo dovelo je do eksponencijalnog rasta uporabe nematoda u biološkoj kontroli (Arthurs i sur., 2004.). Svemu tome pridonijeli su i rezultati koji su dokazali da te nematode nisu štetne za ljude, životinje ili biljke.

2.1.1. *Heterorhabditis bacteriophora*

Heterorhabditis bacteriophora je parazit iz porodice Heterorhabditidae u čijem su probavilu naseljene simbiotske bakterije s insekticidnim djelovanjem. Prvi put opisana je 1975. godine kao novi rod, vrsta i porodica (Heterorhabditidae) iz roda Rhabditida (Poinar, 1975.). Važno je reći da je treći stadij ličinki, *dauerni juvenil* (DJ) ujedno i jedini infektivni stadij. Infektivne ličinke (IL) ove porodice prenose specifične Gram-negativne bakterije iz roda *Photorhabdus* u tijelo kukca domaćina (Poinar i sur., 1977.). Prvi puta ova je simbiotska bakterija opisana kao *Xenorhabdus luminescens* (Thomas i Poinar, 1979.). Danas se naziva *Photorhabdus luminescens* (Fischer-Le Saux i sur., 1999.). Nematode zaražene ovom vrstom bakterije svijetle u mraku zbog iluminiscencije (Slika 6). U mutualističkom odnosu, nematode štite bakterije od štetnih vanjskih uvjeta, dok bakterije njima zauzvrat ubijaju domaćina te su izvor hrane za nematode (Poinar i Thomas, 1966.). U slučaju da se napad nematoda odvija bez prisutstva simbiotskih bakterija, do ugibanja domaćina će doći tek za par dana ili tjedana (Gaugler, 1992.).



Slika 6. *Photorhabdus luminescens* u entomopatogenoj nematodi *Heterorhabditis bacteriophora*

(Izvor: <http://www.wormbook.org>)

Također, uočeno je da kukci i ličinke koje su parazitirane sa *Steinernema* vrstama poprime žutosmeđu boju, dok one koje su parazitirane *Heterorhabditis* vrstama pocrvene (Slika 7). Važno je za reći da crvenilo nije uvijek konkretan dokaz parazitacije ovom nematodom, već je važan i pregled mikroskopom.

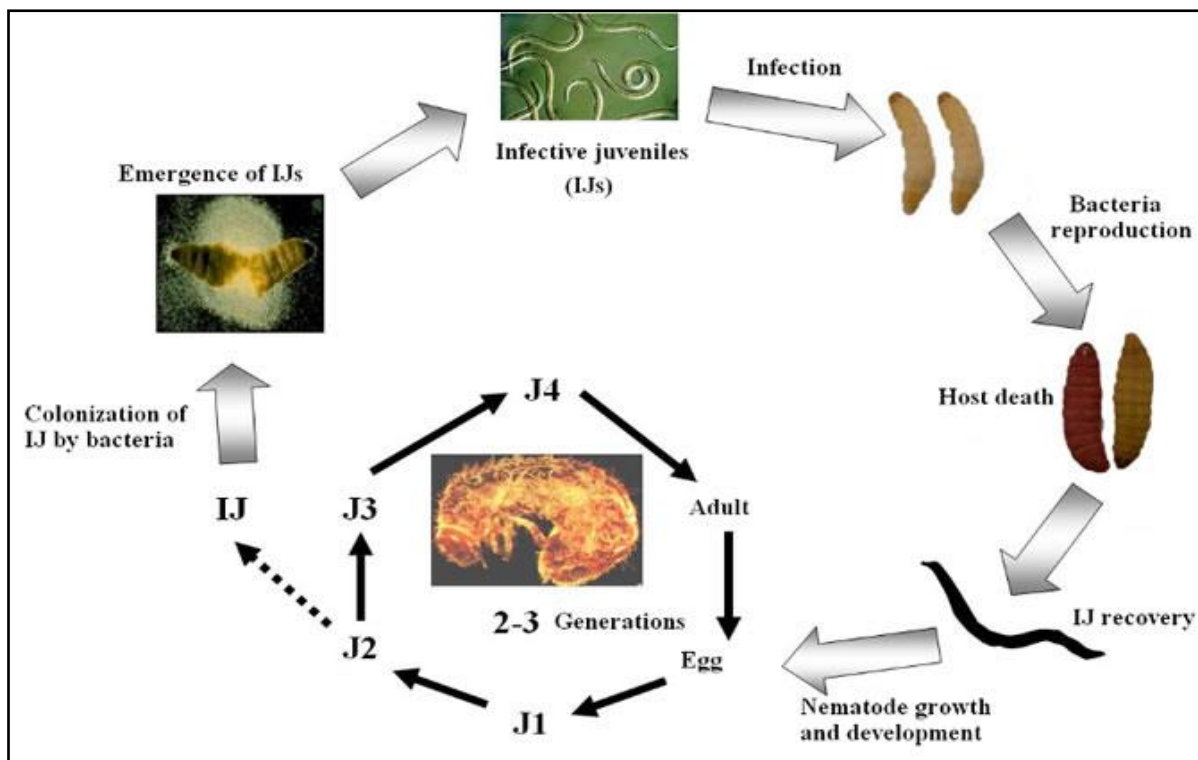


Slika 7. Crveno obojene uginule ličinke zaražene s *H. bacteriophora*

(Foto: Petra Mazur, 2017.)

H. bacteriophora ima specifične karakteristike u odnosu na druge entomopatogene nematode, kao što su kratak životni ciklus, visoka plodnost, način reprodukcije i dužina tijela.

Životni ciklus *H. bacteriophora* (Slika 7) se sastoji od jaja, četiri stadija ličinke i odraslog stadija. Ličinke trećeg stadija (infektivni stadij), sposobne su u tlu preživjeti par dana, pa do par mjeseci. Kada dospiju u kukca, u hemocel ispuštaju bakterije te se hrane bakterijama koje su one same donijele u domaćina. Tada se presvuku u ličinke četvrtog stadija iz kojih izlaze spolno zreli oblici prve generacije. Nakon što kopuliraju, ženke odlože jaja u kojima se razvijaju ličinke prvog stadija. Zatim se opet presvlače i događa se razvoj ličinki svih stadija te razvoj mužjaka i ženki druge generacije. Zatim kopuliraju odrasli, a iz nastalih jaja razvijaju se ličinke prvog i drugog stadija. Svi stadiji ove nematode hrane se tkivom kukca i hemolimfom. Ličinke kasnijeg drugog stadija prestaju s hranjenjem, unose bakterije u njihovo probavilo, presvuku se u ličinke trećeg stadija, napuste uginulog kukca te odlaze u tlo tražiti novog domaćina (Smart, 1995.). Trajanje životnog ciklusa od ulaska infektivne ličinke sve do njezinog izlaska iz kukca je različito i ovisi o vrsti nematode i kukca, a najviše o ekološkim čimbenicima, posebice temperaturi na koju su nematode vrlo osjetljive.



Slika 8. Životni ciklus *H. bacteriophora*

(Izvor: <http://www.giabr.gd.cn>)

S obzirom na sve ove činjenice i znajući kako je puno štetnika postalo rezistentno na neke kemijske pesticide, primjena *H. bacteriophora* ima sve veći značaj. Tako danas na tržištu imamo više pripravaka na osnovi *H. bacteriophora* za suzbijanje štetnih kukaca, a neki od njih su: NemaGreen® i Nematop® (distributer tvrtka Pro-eco).

NemaGreen® (Slika 8) se preporučuje u primjeni protiv ličinki listorožaca u travnjacima. Primjenjivati se može od sredine lipnja do kraja rujna, a najpovoljnije bi bilo primjenu vršiti pri temperaturi tla od 12 do 25 °C. Učinkovitost ovog sredstva očekuje se u mortalitetu štetnika većem od 80%. Napadnute ličinke kukaca poprimiti će crveno-smeđu boju, a uginuti će nakon 7 do 14 dana. Budući da se nematode razmnožavaju u uginulim ličinkama, njihova brojnost u tlu nakon prve primjene konstantno će se povećavati. Primjenjuje se tako da se pripravak pomiješa s vodom. Ukoliko će otopina stajati neko vrijeme, važno ju je promiješati svakih 5 minuta zato što se nematode zbog gravitacije talože na dno. Pripremljenom otopinom zalijeva se travnjak, pazeći da je vlažan kako se nematode ne bi osušile. Kako su nematode osjetljive na UV zračenje, preporučuje se tretiranje u jutarnje ili večernje sate. Nakon tretiranja, važno je travnjak zaliti s 2 do 5 litara vode/m² kako bi se nematode isprale u tlo. Slijedećih 6 tjedana tlo se treba održavati vlažnim. Pripravak se treba što prije potrošiti

jer stajanjem nematode gube svoja svojstva. Entomopatogene nematode se mogu primjeniti u kombinaciji s ostalim kemijskim sredstvima za zaštitu bilja. Interakcija nematoda i pesticida zavisi o vrsti nematode, ali i aktivne tvari, doze i vremena apliciranja, ali u većini slučajeva ne postoji inhibitorski utjecaj pesticida na djelovanje nematoda (Koppenhöfer i Grewal, 2005.).

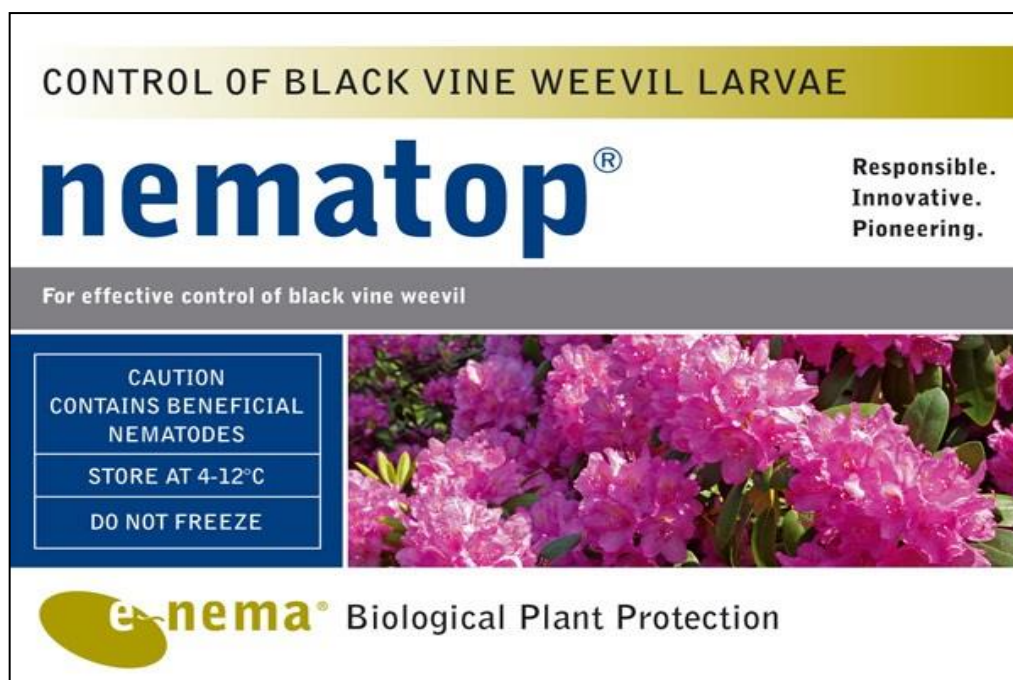


Slika 9. Pripravak Nema-green

(Izvor: <http://www.proeco.hr>)

Nematop® (Slika 9) djeluje samo na ličinke i očekuje se više od 80% mortaliteta štetnih kukaca. Primjenjuje se u travnju i svibnju te opet od kolovoza do listopada. Pri primjeni, temperatura tla trebala bi biti 11 °C. Ukoliko su temperature ispod 8 °C, primjenjuje se NEMATOP COOL®. Ličinke štetnog kukca ugibaju nakon 2 do 3 dana. Nakon 2 do 3 tjedna nematode napuštaju uginulu ličinku i traže nove domaćine. Pripravak se primjenjuje slično kao Nema-green.

Aplikacija entomopatogenih nematoda zavisi od poljoprivredne kulture i ciljane štetočinke. Entomopatogene nematode mogu biti primjenjene bilo kojom opremom za aplikaciju sredstva za zaštitu bilja, pa čak i sustavima za navodnjavanje.



Slika 10. Pripravak Nematop

(Izvor: <http://www.proeco.hr>)

Važno je voditi računa o miješanju, veličini mlaznice, tlaku i temperaturi. Budući da je specifična gustoća tijela nematoda $1,05 \text{ g/cm}^3$, one se u vodenoj otopini talože te se moraju kontinuirano miješati. Otvori mlaznica trebali bi biti veći od $500 \text{ }\mu\text{m}$, a sita se trebaju ukloniti. Tlak ne bi trebao biti veći od 10 bara. Temperatura ne smije biti veća od $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Entomopatogene nematode se većinom apliciraju u dozi od $2.5 \times 10^9 \text{ DJ/ha}$ (Shapiro-Ilan i sur., 2012.). Kako su nematode organizmi koji ne mogu bez vode, bolje će djelovati u tlima koja su vlažnija. Optimalna vlažnost zemljišta ovisi o vrsti nematode i tipu tla (Koppenhöfer et. al., 1995.).

Što se tiče sigurnosti i legislative o uporabi entomopatogenih nematoda, detaljan pregled toga izradio je Ehlers (2005.). Entomopatogene nematode nisu štetne za ljude niti za životnu sredinu. Ne mogu imati negativan utjecaj na neciljane organizme jer nisu dugo aktivne.

Ukoliko se introducira neka egzotična vrsta, ona teško da može dovesti do potiskivanja autohtone vrste, ali može ju privremeno smanjiti zbog kompeticijskog odnosa prema autohtonoj vrsti tj. domaćinu. Entomopatogene nematode svrstane su u grupu makroorganizama s predatorskim i parazitnim kukcima te su izuzete od registracije. Zadnjih godina, kemijske kuće na tržište plasiraju proizvode za biološku kontrolu upravo s entomopatogenim nematodama.

2.2. KESTENJASTI BRAŠNAR (*Tribolium castaneum*)

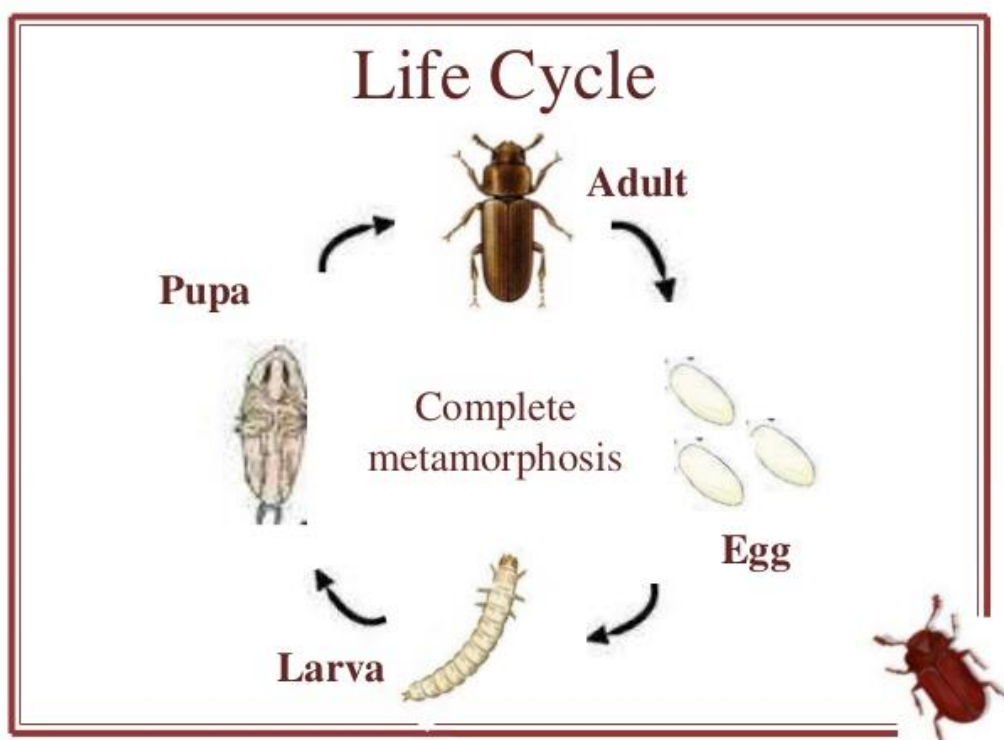
Kestenjasti brašnar (Slika 10) *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797.) je polifagni, skladišni štetnik koji iz reda Coleoptera (tvrdokrilci, kornjaši) i rod *Tribolium*, a rasprostranjen je u cijelom svijetu. Zovu se brašnari zato što napadaju i oštećuju uskladištenu zrnatu robu i brašno. Po načinu šteta pri svojoj ishrani svrstan je u sekundarne štetnike, iako ponekada mogu biti i primarni. Najčešće napadaju žitarice i žitne prerađevine te suhi materijal biljnog i životinjskog podrijetla. Ova vrsta ima visok ekonomski prag štetnosti. Vrlo je česta vrsta koja napada uskladištenu pšenicu i iako je sekundarni štetnik, može oštećivati zdrava zrna s vlagom 12.2% i više (Korunić, 1990.).

Boja tijela im je crvenkastosmeđa, kestenjasta, čak i hrdastosmeđa. Imaju spljošteno i produženo tijelo, 3 – 4 mm dugo. Jajašca su im dimenzija 0,61 mm x 0,35 mm te su prozirne ili bijele boje (Leelaja i sur., 2007.). Ličinka je 6 – 7 mm duga, bijelo-žute boje, vrlo pokretna i brza te imaju smeđu glavu. Ima 6 nogu. Kukuljica je bijela, a starenjem tamni (Lyon, 2000.). Ženke odlažu nekoliko stotina jaja u dvije godine, koliko im prosječno traje životni vijek. Razvoj ovisi o temperaturi, a najpovoljnija im je od 20 do 42 °C, a traje od jednog pa do više mjeseci. U našim uvjetima skladištenja imaju 2 generacije na godinu. Termofilna je vrsta te kod 7 °C ugiba nakon 25 dana, a kod -6 °C nakon 24 sata (Korunić, 1990.).



Slika 11. *Tribolium castaneum*
(Izvor: <https://www.ars.usda.gov>)

Jedan je od najdugovječnijih štetnika (živi i do 3 godine) (Mason, 2003.). *T. castaneum* pripada skupini kukaca koji imaju potpunu preobrazbu (Slika 11). Reproductivnost ženki iznosi 3 – 4 mjeseca, a mužjaka 4 – 6 mjeseci. Ženke odlažu oko 300 jaja u brašno ili drugu hranu u razdoblju od 5 do 8 mjeseci. Iz jaja izlaze ličinke (Slika 12) koje se razvijaju u prerađenim žitnim proizvodima, a kod cijelog zrna najviše vole klicu (White, 1988.). Presvlače se 5 do 9 puta, ovisno o uvjetima okoliša te dostupnoj hrani, dok se u normalnim uvjetima presvuku 6 puta, a transformirati će se u kukuljice (Bucher, 2006.).



Slika 12. Životni ciklus *Tribolium castaneum*

(Izvor: <https://www.slideshare.net>)

Za razvoj kestenjastog brašnara najpogodnija je temperatura od 35 °C i RZV 60 – 80%. Što je niža temperatura, razvoj je sporiji. Imago su vrlo aktivni, brzi i prave štete veće nego što mogu napraviti ličinke. Može ih se naći na površini uskladištene robe ili duboko u njoj. Roba zaražena ovim štetnikom ima neugodan miris i ružičaste je boje. Iz skladišta mogu izaći tako da prelete, a oni koji ostaju u skladištu skrivaju se u pukotine i izvor su zaraze za slijedeću robu koja će se spremati u isto skladište (Liška, 2011.).



Slika 13. Ličinke *Tribolium castaneum*
(Izvor: <http://www.flickriver.com>)

2.2.1. Suzbijanje *Tribolium castaneum*

Mjere suzbijanja kestenjastog brašnara, kao i drugih štetnika koje nalazimo u skladištu, dijelimo na preventivne i kurativne. Pod preventivne mjere podrazumijevamo sve one mjere kojima se sprječava pojava štetnika i uništava postojeća malobrojna populacija. Kakve god te mjere bile, dijelimo ih na (Hamel, 2010.; Kalinović i Rozman, 2002.; Korunić, 1990.):

Higijenske mjere:

- Podrazumijevaju čišćenje uređaja i prostora, čišćenje okoliša, popravak oštećenih mjesta kroz koja se štetnici mogu provući i ući, stavljanje zaštitnih mreža na prozore, uporaba sredstava za zaštitu bilja ili biocida;
- Prozračivanje prostora u cilju izjednačavanja temperature u masi zrnate robe i održavanje temperature ispod 21 °C ili iznad 34 °C, između kojih su optimalne temperature za razvoj štetnika.

Fizikalne i mehaničke mjere:

- mjerenje temperature robe, pregled i uzorkovanje robe;
- primjena niske i visoke temperature, te korištenje inertnih prašiva (dijatomejska zemlja);
- čišćenje zrna od primjesa (lom zrna, prašina, sjeme korova) čime se onemogućava razvoj sekundarnih vrsta kukaca, odstranjivanje zaraženih zrna s kukcima kao i kukaca iz uskladištenih proizvoda ili prostora.

Kemijske mjere:

- uporaba insekticida i fumiganata: insekticidi koji imaju dopuštenje za uporabu u skladištima su sredstva za zaštitu bilja na osnovi djelatnih tvari deltametrina, pirimifosmetila, te biocidi na osnovi različitih djelatnih tvari (piretrin itd.). Fumiganti su insekticidi koji suzbijaju skladišne štetnike oslobađanjem toksičnog plina koji prodire u robu, sve pukotine i oštećenja, a danas su u uporabi sredstva na osnovi plina fosfina. Postoji veliki problem primjene samo jednog plina radi moguće pojave rezistentnosti kukaca.

Biološke mjere:

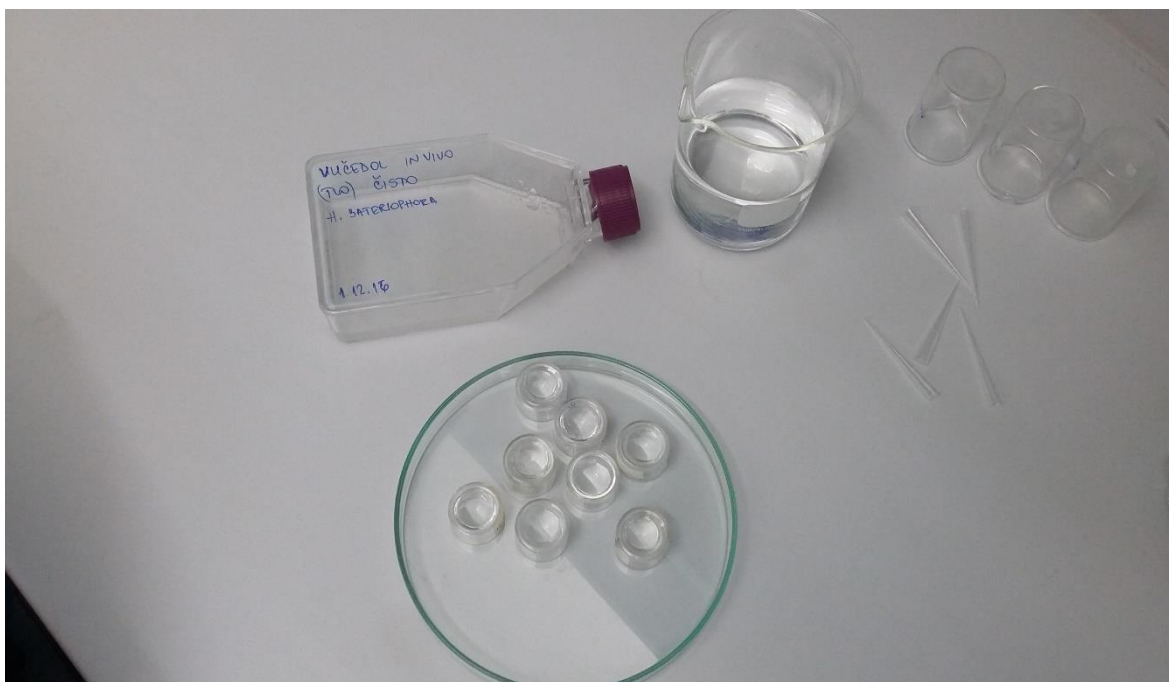
- primjena sredstava na osnovi *Bacillus thuringiensis* ili prirodnih spojeva ekstrahiranih iz biljaka ili raznih predatora (grinje) ili parazita (parazitske osice).

3. MATERIJALI I METODE

Pokus je proveden od ožujka do lipnja 2017. godine u Laboratoriju za entomologiju i nematologiju, Zavoda za fitomedicinu na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek.

3.1. Uzgoj nematoda

Uzgoj entomopatogenih nematoda *H. bacteriophora* proveden je nekoliko mjeseci prije provođenja pokusa. Gusjenice malog voskovog moljca *Achroia grisella* uzgajaju se na umjetnoj hrani prema metodi Jones i sur. (2002.), te su umjetno zaražene s hrvatskih sojem *H. bacteriophora*, a čije prisustvo je prvi puta utvrđeno i izdvojen je iz tla s područja Vučedola tijekom 2016. godine (Slika 14).

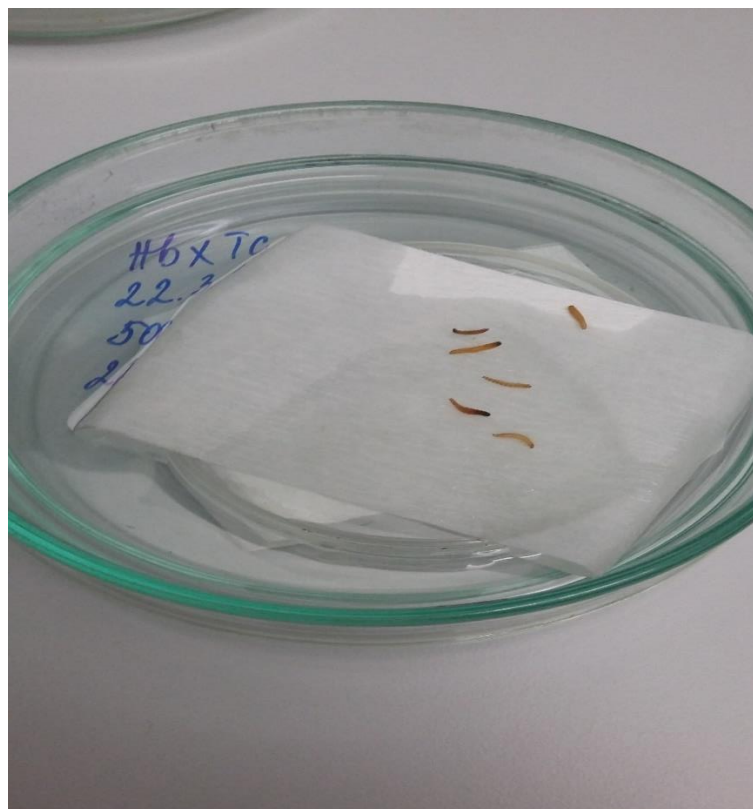


Slika 14. Hrvatski soj *H. bacteriophora*

(Foto: Petra Mazur, 2017.)

Ličinke malog voskovog moljca se izdvajaju u Petrijeve zdjelice u kojima je položen vlažni filter papir i zaražavaju s nematodama *H. bacteriophora* s ciljem dobivanja novih generacija nematoda. Uginule gusjenice potrebno je izdvojiti na *White trap* (White, 1925.) (hrv. „White-ova zamka“) kako bi se osušile (Slika 15). Kada sve ličinke uginu i osuše se, u *White trap* se dodaje oko 20 ml destilirane vode. Nematode će u prisutstvu vode, kroz filter papir,

prijeći u vodu koja se nalazi u većoj Petrijevoj posudi i tu se zadržavati. Nove generacije nematoda (ne starije od dva tjedna) korištene su u pokusu.



Slika 15. *White trap* na koji su postavljene uginule ličinke *T. castaneum*
(Foto: Petra Mazur, 2017.)

3.2. Uzgoj kestenjastog brašnara (*Tribolium castaneum*)

Uzgoj test kukaca obavljen je u kontroliranim uvjetima na 30 ± 1 °C; 70-80% rvz; u tami (Liu i sur., 1999). Uzgojna podloga korištena za sve razvojne stadije je pšenično oštro brašno i suhi kvasac u omjeru 10:1.

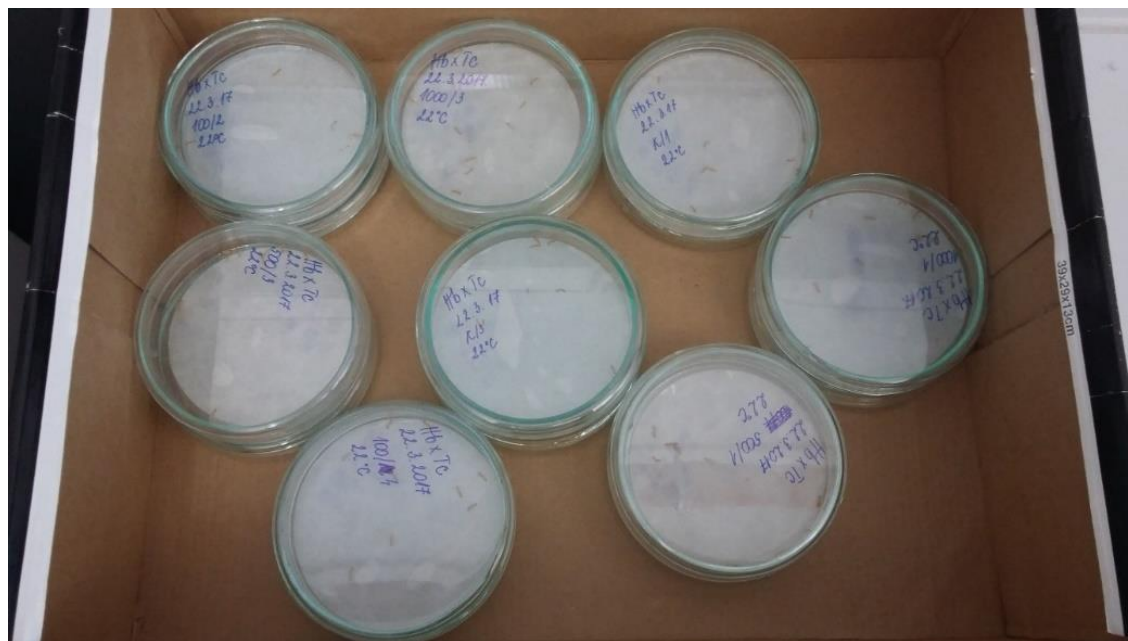
Uzgoj imaga F1 generacije: prosijavanjem uzgojnih podloga s kukcima svakih 25 dana, te odvajanje ličinki i stavljanje na razvoj do imaga starosti 2-4 tjedna u kontroliranim uvjetima (Rozman, 2003).

Uzgoj ličinki i kukuljica: populacija kestenjastog brašnara, u stadiju imaga pomiješanog spola, stavljena je u staklenke s hranjivim medijem radi kopulacije i polijeganja jajašaca. Uzgoj je ostavljen tri dana u kontroliranim uvjetima na 30 ± 1 °C; 70-80% rvz, u tami. Nakon

trećeg dana izdvojeni su odrasli (imago), a preostalo brašno s položenim jajašcima ostavljeno je pri istim uvjetima na 16 dana za uzgoj ličinki.

3.3. Utvrđivanje patogenosti entomopatogenih nematoda za odrasle stadije i ličinke kestenjastog brašnara

Kako bi utvrdili učinkovitost nematoda u suzbijanju ličinki kestenjastog brašnara, 22. ožujka 2017. godine postavljen je pokus s tretmanima 100, 500 i 1000 infektivnih ličinki *H. bacteriophora* po ličinki kestenjastog brašnara, u četiri ponavljanja (slika 16). U kontrolnom tretmanu ličinke kestenjastog brašnara tretirane su destiliranom vodom. Svaki tretman i ponavljanje se sastojao od petrijevke u kojoj je položen vlažni filter papir, dodano je 10 ličinki kestenjastog brašnara i 1 mL destilirane vode s potrebnom koncentracijom nematoda.



Slika 16. Postavljanje pokusa ispitivanja patogenosti *Heterorhabditis bacteriophora* prema ličinkama *Tribolium castaneum*

(Foto: Petra Mazur, 2017.)

Pokus je proveden u tami, na dvije temperature (15 °C i 22 °C, 65% RVZ). Za kontrolirane uvjete korištena je klima komora, a ostali dio pokusa je proveden na sobnoj temperaturi.

Pokus s odraslim stadijima kestenjastog brašnara postavljen je 2. svibnja 2017. godine. Tretmani su bili 50, 100 i 500 infektivnih ličinki *H. bacteriophora* po odraslom kukcu, a svi ostali parametri, uvjeti i metodologija je bila istovjetna pokusu s ličinkama istog kukca.

Hrana za kukce nije dodavana tijekom pokusa, dok je ovisno o potrebi dodavana destilirana voda kako se ne bi nematode osušile i uginule (Slika 17).



Slika 17. Dodavanje destilirane vode

(Foto: Ivana Majić, 2017.)

Svaki drugi dan pratio se mortalitet ličinki i isto tako i odraslih kukaca i bilježio se u tablicu. Moratitet ličinki pratio se od 22. ožujka do 31. ožujka 2017., svaki drugi dan. Ličinke koje su uginule odmah su stavljane na sušenje na *White trap*, kako bi se potvrdilo da su kukci uginuli zbog parazitizma nematoda. *White trap* se sastoji od veće Petrijeve posude, male Petrijeve posude odnosno njezinog dna te filter papira koji je rezan u dimenziji 10 x 4 cm. Dno male Petrijeve posude okrenuto je i obloženo filter papirom, te stavljeno u veliku Petrijevu posudu, a ličinke su stavljane na filter papir. Nakon što su sve ličinke uginule, u Petrijevu posudu dodano je 25 mL vode tako da filter papir bude mokar i da je u doticaju s vodom. Na filter papir položene su uginule ličinke. Tijekom slijedeća dva tjedna mikroskopom se pratio izlazak nematoda. Deseti dan nematode su izašle iz ličinki, a pregled na njihovu zastupljenost tj. prisutstvo odredilo se u svakoj Petrijevoj zdjelici na 22 °C.

3.4. Analiza podataka

Podaci su analizirani standardnim statističkim metodama (PROC ANOVA) pri čemu je razlika srednjih vrijednosti testirana s Tukey's testom, a interakcija između varijabli je testirana generaliziranim linearnim modelom (PROC GLM). Test Shapiro Wilk je ukazao na neujednačenu distribuciju podataka (PROC UNIVARIATE), te je učinjena transformacija podataka ($\log(n+1)$) prije svih analiza, dok su u tablicama prikazani rezultati nakon povratne transformacije (SAS 9.2; SAS Institute, 2007.).

4. REZULTATI

U tablici 1 je prikazana analiza rezultata mortaliteta kestenjastog brašnara primjenjujući GLM metodu. Vidljivo je da postoji statistički značajan učinak tretmana nematoda na ličinke i odrasle stadije kestenjastog brašnara. Također, utvrđena je signifikantnost rezultata interakcije tretmana i temperature, no temperatura kao pojedinačni čimbenik u ovom pokusu nije imala značajan utjecaj na patogenost nematoda, tj. na mortalitet kukaca.

Tablica 1. GLM analiza rezultata mortaliteta kestenjastog brašnara

Stadij		DF	F	Pr>F
LIČINKE	Tretman	3	4,16	0,02*
	Temperatura	1	1,05	0,31
	Tretman x temperatura	3	3,39	0,03*
IMAGO	Tretman	3	10,56	0,00*
	Temperatura	1	0,03	0,86
	Tretman x temperatura	3	1,54	0,23

Vrijednosti obilježene zvjezdicom su statističke značajne

U tablici 2 prikazane su srednje vrijednosti mortaliteta kukaca po stadiju, tretmanu pri temperaturi od 15 °C. Najveći mortalitet za ličinke postignut je četvrti dan nakon postavljanja pokusa, pri tretmanu 1000 infektivnih ličinki nematoda po ličinki kestenjastog brašnara. Ostali tretmani su postigli zadovoljavajući mortalitet od čak 97,5%. No, u kontroli je također utvrđen vrlo visoki mortalitet ličinki što ukazuje na problem u postavljanju pokusa. Vjerojatno je količina vode koja je dodana naknadno u Petrijevkama škodila ličinkama. U Petrijevkama se nije nalazio višak tekućine, pa ubuduće treba iskušati druge metode ispitivanja patogenosti entomopatogenih nematoda prema ličinkama kestenjastog brašnara.

Tablica 2. Srednje vrijednosti broja uginulih kukaca i mortalitet kestenjastog brašnara pri temperaturi od 15 °C

Stadij	Tretman	Dan poslije postavljanja pokusa						Mortalitet, (%)
		2.	4.	6.	8.	10.	12.	
LIČINKE	100	0,25	0,50	6,75	3	0	0	97,5 b
	500	0,75	5,75	3,25	0	0	0	97,5 b
	1000	2,75	7	0	1	0	0	100 a
	K	4,75	2,75	2	1,5	0	0	97,5 b
IMAGO	50	0,5	0,5	0	0	0	0	12,5 a
	100	0	1,75	0,25	2,5	0	0	50 b
	500	0,5	0,25	0,5	0	0	0	17,5 a
	K	0	0	0	0	0	0	0 c

Vrijednosti u koloni označene različitim slovima statistički značajno se razlikuju ($P < 0,05$)

Iz tablice 2 je vidljivo da su utvrđene statistički značajne razlike između tretmana po mortalitetu ličinki. Tretman s najvišom koncentracijom nematoda (1000 IL/1 ličinka kukca) statistički značajno se razlikuje od ostalih tretmana ($P < 0,05$). No, nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrolnog tretmana i ostala dva tretmana s nematodama. Mortalitet imaga je bio najviši kod tretmana s 100 nematoda po kukcu i statistički značajno se razlikovao od kontrole i ostalih tretmana s nematodama. Kontrolni tretman (bez nematoda) je imao 0% mortaliteta, što ukazuje da su nematode izazvale smrt kod kukaca.

Neke uginule ličinke koje su bile zaražene nematodama, bile su crvene do crvenosmeđe boje. To je prvi znak zaraze nematodama, ali je važna provjera mikroskopom.

U tablici 3. prikazane su srednje vrijednosti mortaliteta kukaca po stadiju, tretmanu i temperaturi od 22 °C. Postignut je učinkovitiji mortalitet za oba stadija u odnosu na rezultate iz pokusa na temperaturi od 15 °C. Kod ličinki u sva tri tretmana postignut je 100%-tni mortalitet što je zadovoljavajuće u usporedbi s istim tretmanima za ličinke u tablici 2.

Tablica 3. Srednje vrijednosti broja uginulih kukaca i mortalitet kestenjastog brašnara pri temperaturi od 22 °C

Stadij	Tretman	Dan poslije infekcije						Mortalitet %
		2.	4.	6.	8.	10.	12.	
LIČINKE	100	1,75	5,5	3,6	0	0	0	100 a
	500	0,5	7	1,75	1,5	0	0	100 a
	1000	1,25	6,5	2	1	0	0	100 a
	K	0,75	3,75	3,6	1,6	0	0	85 a
IMAGO	50	0	0,25	0	0	0	0	5 b
	100	0	2,5	0,75	0,25	0	0	42,5 a
	500	0,5	0,75	0	0	0	0	17,5 ab
	K	0	0,75	0,25	0	0	0	12,5 b

Vrijednosti u koloni označene različitim slovima statistički značajno se razlikuju ($P < 0,05$)

Na temperaturi od 22 °C utvrđene su statistički značajne razlike između srednjih vrijednosti mortaliteta imaga u tretmanu 100 i tretmana 50 i kontrole. Dok kod ličinki nije utvrđena statistički značajna razlika u mortalitetu između tretmana.

Najveći mortalitet imaga od 42,5 % postignut je kod tretmana od 100 nematoda, a najmanji izazvani mortalitet imaga bio je 5 %.

U prethodnim tablicama prikazane su i obuhvaćene srednje vrijednosti mortaliteta ovisno o temperaturi, dok je u tablici 4 prikazana srednja vrijednost neovisno o temperaturi gdje se tretman od 1000 nematoda opet istaknuo u svojoj 100%-tnoj učinkovitosti.

Tablica 4. Srednje vrijednosti broja uginulih kukaca i mortalitet kestenjastog brašnara

Stadij	Tretman	Dan poslije infekcije						Mortalitet %
		2.	4.	6.	8.	10.	12.	
LIČINKE	100	1	3	5,42	3	0	0	98,7ab
	500	0,62	6,37	2,5	1	0	0	98,7ab
	1000	2	6,75	1,6	1	0	0	100b
	K	2,75	3,25	2,83	1,6	0	0	91,2a
IMAGO	50	0,25	0,37	0	0	0	0	8,7b
	100	0	2,12	0,5	1,37	0	0	46,2a
	500	0,5	0,5	0,25	0	0	0	17,5a
	K	0	0,37	0,12	0	0	0	6,2b

Vrijednosti u koloni označene različitim slovima statistički značajno se razlikuju ($P < 0,05$)

Iz ove tablice je vidljivo da je utvrđena patogenost nematoda kod kestenjastog brašnara. Utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolnog tretmana i tretmana s najvišom koncentracijom nematoda kod ličinki, dok je kod odraslih oblika utvrđena statistički značajna razlika između tretmana s nematodama, ali i između kontrole i tretmana s 100 nematoda po imagu. Ovi rezultati ukazuju da koncentracija nematoda po kukcu ima veliki značaj u konačnom mortalitetu kestenjastog brašnara.

5. RASPRAVA

Kestenjasti brašnar (*T. castaneum*) izrazito je otporan kukac i tijekom dva tjedna praćenja mortaliteta nisu svi kukci uginuli, a bez hrane mogu izdržati od 20 do 40 dana (Korunić, 1999.). Također je uočeno da se u nedostatak hrane pojavio kanibalizam, što je potvrđeno i u istraživanju od Liška (2011.). U usporedbi s tim, postoji istraživanje na manjem brašнару (*Alphitobius diaperinus*) koji je također vrlo otporan i jako teško se suzbija, a koje su proveli Ivezić i sur., (2011.). Manji brašnar *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797.) (Coleoptera: Tenebrionidae) velik je problem u proizvodnji peradi. S obzirom na to da se teško suzbija, pokus je također imao za cilj utvrditi patogenost entomopatogene nematode *H. bacteriophora* na imago i ličinke manjeg brašnara. Pokus je postavljen sa dvije koncentracije nematoda (1000 IL / 1 odrasli stadij kukca i 2000 IL / 1 ličinka kukca) uz kontrolni tretman te pri uvjetima od 30 °C i 70% RVZ. Pri tome je utvrđeno da je nakon tri dana postignut mortalitet kod svih kukaca i ličinki, za razliku od pokusa s *T. castaneum* gdje je za mortalitet svih kukaca i ličinki trebalo više od tri dana (manja koncentracija nematoda). U tom istraživanju utvrđeno je stvaranje novih generacija pomoću mikroskopa, a nematode su također, kao i u ovom radu, izdvojene pomoću *White trap*. Usporedno s tim, u Petrijevim zdjelicama u kojima je proveden pokus s *T. castaneum*, a koje su bile u komori na 15 °C napravljen je pregled mikroskopom, a uočeno je da nematoda ima manje za razliku od tretmana na 22 °C što se pripisuje tome da su slabo pokretne na manjim temperaturama, a u nepovoljnim uvjetima te prelaze u dauerni stadij. Kod nematoda u tretmanima čuvanim na 22 °C uočeno je da je brojnost populacija nematoda velika, da su vrlo pokretne, a osmi dan nakon postavljanja uginulih kukaca na *White trap* uočen je izlazak novih generacija infektivnih ličinki *H. bacteriophora*.

Mortalitet postignut kod imaga *T. castaneum* nije bio zadovoljavajući (tablica 2), no u odnosu na kontrolni tretman utvrđen je insekticidni potencijal entomopatogenih nematoda. To upućuje na to da patogenost entomopatogene vrste *H. bacteriophora* ovisi o stadiju kukca kestenjastog brašnara.

Najbolji učinak kod odraslih stadija je imao tretman od 100 nematoda gdje je postignut mortalitet od 50%, što je dosta slabije u odnosu na isti tretman za ličinke. To se može pripisati i objasniti time što tijelo imaga sadrži hitin, dok je ličinka obavijena mekom opnom koju je nematodama lakše „probiti“ i ući u kukca. Hitin predstavlja zaštitnu ulogu kod kukaca i slična je ulozi koju ima celuloza za biljke.

Mortalitet u pokusu s *A. diaperinus* dokazan je 100%, dok je, recimo, u istraživanju utjecaja nematoda *H. indica* i *H. riborave* na manjeg brašnara, utvrđen mortalitet 50 – 80% (Pezowicz, 2003.).

Entomopatogene nematode roda *Heterorhabditis* pokazuju veliki potencijal u biološkom suzbijaju vrlo otpornih štetnika, a njihovo proučavanje značajno doprinosi struci. Samo, potrebno je provesti još puno istraživanja uvažavajući druge biotske i abiotske čimbenike te utvrditi kakvo je tada djelovanje entomopatogenih nematoda.

6. Zaključak

Ovim istraživanjem ispitana je osjetljivost kestenjastog brašnara *T. castaneum* na entomopatogene nematode *H. bacteriophora* u laboratorijskim uvjetima. Provedenim istraživanjem dobiveni su rezultati koji su pokazali da su entomopatogene nematode *H. bacteriophora* učinkovitije u izazivanju mortaliteta ličinki kestenjastog brašnara u odnosu na odrasli stadij, te je povoljnija temperatura okoline od 22 °C na njihovu patogenost, u odnosu na 15 °C. Kod ličinki je utvrđen 98% i viši mortalitet u svim tretmanima, no pokus treba ponoviti s obzirom da je i u kontrolnom tretmanu utvrđen slično visok mortalitet. Kod odraslih stadija (imago) utvrđena je statistički značajna razlika između tretmana. Tako je tretman od 100 infektivnih ličinki nematoda po kukcu izazvao mortalitet kod 46% ukupne brojnosti kukaca.

Entomopatogene nematode dokazale su insekticidni učinak na kestenjastog brašnara, no treba provesti dodatna istraživanja, uvažavajući drugu metodologiju i druge sojeve i vrste entomopatogenih nematoda.

7. Popis literature

1. Arthurs, S., Heinz, K. M., Prasifka, J. R. (2004.): An analysis of using entomopathogenic nematodes against above-ground pests. *Bulletin of Entomological Research*. 94(4):297 – 306.
2. Boemare, N. (2002.): Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. *Entomopathogenic Nematology*. Wallingford, UK: CABI Publishing. 36 – 36.
3. Bucher, G., Wohlfrom, H., Schinko, J. B., Klinger, M. (2006.): Maintenance of segment and appendage primordia by the *Tribolium* gene *knödel*. *Mechanisms of Development*. 123 (6): 430 – 439.
4. Campbell, J. F., Gaugler, R. (1993.): Nictation Behaviour and Its Ecological Implications in the Host Search Strategies of Entomopathogenic Nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). *Behaviour*. 126(3): 155 – 169.
5. Campbell, J. F., Kaya, H. K. (2000.): Influence of insect associated cues on the jumping behavior of entomopathogenic nematodes (*steinernema* spp.). *Behaviour*. 137(5): 591 – 609.
6. Ehlers, R. U. (2005.): Forum on Safety and Regulations. In: Grewal, P.S. Ehlers, R.-U. and Shapiro-Ilan, D.I. (eds.) *Nematodes as biocontrol agents*. Wallington: CABI Publishing pp: 107-114.
7. Gaugler, R., Lewis, E. E., Harrison, R. (1992.): Entomopathogenic nematode host finding: response to host contact cues by cruise and ambush foragers. *Parasitology*. 105(2): 309 – 315.
8. Gaugler, R., Bilgrami, A. L., Shapiro-Ilan, D. I., Adams, B. J. (2006.): Source of trait deterioration in entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* during *in vivo* culture. *Nematology*. 8(3): 397 – 409.
9. Grewal, P. S., Köppenhöfer, A. M. (2005.): *Nematodes as Biocontrol Agents*. CABI Publishing. 115 – 146.
10. Henne, S., Sombke, A., Schmidt-Rhaesa, A. (2017.): Immunohistochemical analysis of the anterior nervous system of the free-living nematode *Plectus* spp. (Nematoda, Plectidae). *Zoomorphology*, 136: 175. <https://doi.org/10.1007/s00435-017-0347-x>
11. Ivezić, M. (2014.): *Fitonematologija*. Osijek, Poljoprivredni fakultet u Osijeku.
12. Johnson, A. V. (1998.): Degradation of fenamiphos in agricultural production soil. *Journal of Nematology*. 30(1): 40 – 44.

13. Kanzaki, N., Ragsdale, E. J., Herrmann, M., Mayer, W. E., Sommer, R. J. (2012.): Description of three *Pristionchus* species (Nematoda: Diplogastridae) from Japan that form a cryptic species complex with the model organism *P. pacificus*. *Zoological science*, 29(6): 403-417.
14. Kaya, K. H. (1993.): Entomopathogenic nematodes, *Annu. Rev. Entomology*. 38: 181 – 206.
15. Kaya, K. H., Koppenhöfer, A. M. (1996.): Effects of microbial and other antagonistic organism and competition on entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Tehnology*. 6(3): 357 – 372.
16. Koppenhöfer, A. M., Kaya, H. K., Taormino, S. P. (1995.): Infectivity of entomopathogenic nematodes (rhabditida: steinernematidae) at different soil depths and moistures. *Journal of Invertebrate Pathology* 65(2): 193-199.
17. Koppenhöfer, A. M., Kaya, H. K. (1996.): Coexistence of two Steinernematid nematode species (Rhabditida: Steinernematidae) in the presence of two host species. *Applied Soil Ecology*. 4(3): 221 – 230.
18. Lacey, L.A., Georgis, R. (2012.): Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production. *Journal of Nematology*, 44, 218-225.
19. Larsen, B. B., Miller, E. C., Rhodes, M. K., i Wiens, J. J. (2017): Inordinate fondness multiplied and redistributed: the number of species on earth and the new pie of life. *The Quarterly Review of Biology*, 92(3), 229-265.
20. Leelaja, B. C., Rajashekar, Y., Reddy, P. V., Begum, K., Rajendran S. (2007.): Enhanced fumigant toxicity of allyl acetate to stored-product beetles in the presence of carbon dioxide. *Journal of Stored Products Research*. 43(1): 45-48.
21. Liška, A., Rozman, V., Kalinović, I., Eđed, A., Mustač, S., Perhoč, B. (2011.): Bioactivity of 1,8-cineole against red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst). *Poljoprivreda*. 17(1): 58 – 63.
22. Nickle, R. W. (1980.): Possible commercial formulations of insect-parasitic nematodes. *Biotechnology and Bioengineering*. 22(7): 1407 – 1414.
23. Oštrec, Lj. (2001.): Entomopathogenic nematodes for the biological control of pest insects. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 66(3), 179-185.
24. Pezowicz, E. (2003): Effects of Steinernematidae and Heterorhabditidae on the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Bull. IOBC*. 26: 193-195.

25. Poinar, O. G., Thomas, G. M. (1966.): Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteraceae: Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136 (*Neoaplectana* sp. Steinernematidae). Parasitology. 56(2): 385 – 390.
26. Poinar, O. G. (1975.): Description and biology of a new insect parasitic Rhabditoid, *Heterorhabditis acteriophora* n. gen., n. sp. (Rhabditida, Heterorhabditidae n. fam.). Nematologica. 21(4), 463 – 470.
27. Poinar, O. G., Thomas, G. M., Hess, R. (1977.): Characteristics of the specific bacterium associated with *Heterorhabditis bacteriophora* (Heterorhabditidae: Rhabditida). Nematologica. 23(1): 97 – 102. Poinar, O. G., Jackson T., Klein M. (1987.): *Heterorhabditis megidis* sp. n. (Heterorhabditidae: Rhabditida), parasitic in the japanese beetle, *Popillia japonica* (Scarabaeidae: Coleoptera), in Ohio. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 54(1): 53-59.
28. Rozman, V., Kalinović, I., Hamel, D. (2010.): Novine u integriranoj zaštiti uskladištenih proizvoda - osvrt na međunarodnu konferenciju o integriranoj zaštiti uskladištenih proizvoda. International Conference IOBC/WPRS (OILB/SROP) Working Group Integrated Protection of Stored Products, 29. lipanj- 02. srpanj 2009, University of Molise, Campobasso, Italija. Zbornik radova i seminara DDD i ZUPP 2010. – prvo desetljeće u novom stoljeću / Korunić, Z. (ur.). – Zagreb, Plava Rijeka d.o.o. Pisarovina, 2010. 315 – 323.
29. Schroeder, W. J. (1987.): Movement of the entomogenous nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae in soil. The journal of nematology. 19(2): 257 – 259.
30. Smart, G. C. (1995.): entomopathogenic nematodes for the biological control of insects. The journal of nematology. 27(4S): 529 – 534.
31. Stock, S. P., Hunt, D. J. (2005.): Nematodes as biocontrol agents. CABI Publishing. British Library, London, UK.
32. Thomas, G. M., Poinar, O. G. (1979.): *Enorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family *Enterobacteriaceae*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 29: 352-360.
33. White, G. F. (1927.): A method for obtaining infective nematode from cultures. Sciences, 66: 302 – 303.
34. White, N. D. G., Bell, R. J. (1988.): Inheritance of malathion resistance in a strain of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and effects of resistance

genotypes on fecundity and larval survival in malathion-treated wheat. *Journal of Economic Entomology*. 81(1): 381 - 386.

35. Yeates, G.W., Bongers, T., de Goede, R.G.M., Freckman, D.W., Georgieva, S.S. (1993.): Feeding habits in soil nematode families and genera an outline for soil ecologist. *J. Nematol.* 25, 315–331.

8. Sažetak

Rad opisuje laboratorijsko testiranje djelovanja entomopatogenih nematoda *Heterorhabditis bacteriophora* u suzbijanju ličinki i imaga kestenjastog brašnara *Tribolium castaneum* na dvije temperature. Najveći mortalitet ličinki *T. castaneum* postignut je s najvećom koncentracijom nematoda (1000 nematoda /1 ličinka kestenjastog brašnara) i to već drugi dan poslije postavljanja pokusa. Na mortalitet imaga najveći utjecaj imao je tretman 100 nematoda/1 imago kestenjastog brašnara čime je dokazano da su nematode vrste *H. bacteriophora* patogeni *T. castaneum*. *H. bacteriophora* učinkovitije su u izazivanju mortaliteta ličinki kestenjastog brašnara u odnosu na odrasli stadij, te je povoljnija temperatura okoline od 22 °C na njihovu patogenost, u odnosu na 15 °C.

Ključne riječi: entomopatogene nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Tribolium castaneum*, suzbijanje, mortalitet.

9. Summary

The paper describes laboratory testing of the activity of entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* in control of larvae and adults of the red flour beetle *Tribolium castaneum*. The highest mortality of *T. castaneum* larvae was achieved with the highest concentration of nematodes (1000 IJ/ 1 insect larvae) already the second day after the experiment was set up. On the mortality of adults the highest mortality was achieved in treatment with 100 IJ/1 insect adult. This study proved that entomopathogenic nematodes *H. bacteriophora* are pathogenic to *T. castaneum*. Pathogenicity of *H. bacteriophora* was higher in warmer environment (22 °C), i.e. this species was affected by the temperature in this experiment.

Key words: entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Tribolium castaneum*, control, mortality.

10. Popis slika

Slika 1. Crvolik oblik tijela nematode (Foto: Ivana Majić, 2018.) (str. 1.)

Slika 2. Odrasla ženka dječje gliste (*Enterobius vermicularis*) (Izvor: <https://cdc.gov/dpdx/>) (str. 2.)

Slika 3. *Heterorhabditis bacteriophora*, vrsta iz porodice Heterorhabditidae (Izvor: <https://shopping.agrimag.it>) (str. 4.)

Slika 4. *Steinernema scapterisci*, vrsta iz porodice Steinernmatidae (Izvor: <https://forestryimages.org>) (str. 4.)

Slika 5. Entomopatogene nematode vidljive ispod kutikule kukca (Foto: Ivana Majić, 2016.) (str. 5.)

Slika 6. *Photorhabdus luminescens* u entomopatogenoj nematodi *Heterorhabditis bacteriophora* (Izvor: <http://www.wormbook.org/>) (str. 7.)

Slika 7. Crvenilo uginule ličinke zaražene *H. bacteriophora* (Foto: Petra Mazur, 2017.) (str. 8.)

Slika 8. Životni ciklus *H. bacteriophora* (Izvor: <http://giabr.gd.cn/>) (str. 9.)

Slika 9. Pripravak Nemagreen (Izvor: <http://www.proeco.hr/>) (str. 10.)

Slika 10. Pripravak Nematop (Izvor: <http://www.proeco.hr/>) (str. 11.)

Slika 11. *Tribolium castaneum* (Izvor: <https://www.ars.usda.gov/>) (str. 12.)

Slika 12. Životni ciklus *Tribolium castaneum* (Izvor: <https://www.slideshare.net/>) (str. 13.)

Slika 13. Ličinke *Tribolium castaneum* (Izvor: <http://www.flickrriver.com/>) (str. 14.)

Slika 14. Hrvatski soj *H. bacteriophora* (Foto: Petra Mazur, 2017.) (str. 16.)

Slika 15. *White trap* (hrv. bijela zamka) na koji su postavljene uginule ličinke *T. castaneum* (Foto: Petra Mazur, 2017.) (str. 17.)

Slika 16. Postavljanje pokusa ispitivanja patogenosti *Heterorhabditis bacteriophora* prema ličinkama *Tribolium castaneum* (Foto: Petra Mazur, 2017.) (str. 18.)

Slika 17. Dodavanje destilirane vode (Foto: Ivana Majić, 2017.) (str. 19.)

11. Popis tablica

Tablica 1: GLM analiza rezultata mortaliteta kestenjastog brašnara (str. 21.)

Tablica 2: Srednje vrijednosti broja uginulih kukaca i mortalitet kestenjastog brašnara pri temperaturi od 15 °C (str. 22.)

Tablica 3: Srednje vrijednosti broja uginulih kukaca i mortalitet kestenjastog brašnara pri temperaturi od 22 °C (str. 23.)

Tablica 4: Srednje vrijednosti broja uginulih kukaca i mortalitet kestenjastog brašnara (str. 24.)

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet Agrobiotehničkih znanosti Osijek
Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo, smjer Zaštita bilja

Diplomski rad

Učinkovitost entomopatogenih nematoda (*Heterorhabditis bacteriophora*) u suzbijanju kestenjastog brašnara (*Tribolium castaneum*)

Petra Mazur

Sažetak: Rad opisuje laboratorijsko testiranje djelovanja entomopatogenih nematoda *Heterorhabditis bacteriophora* u suzbijanju ličinki i imaga kestenjastog brašnara *Tribolium castaneum* na dvije temperature. Najveći mortalitet ličinki *T. castaneum* postignut je s najvećom koncentracijom nematoda (1000 nematoda /1 ličinka kestenjastog brašnara) i to već drugi dan poslije postavljanja pokusa. Na mortalitet imaga najveći utjecaj imao je tretman 100 nematoda/1 imago kestenjastog brašnara čime je dokazano da su nematode vrste *H. bacteriophora* patogeni *T. castaneum*. *H. bacteriophora* učinkovitije su u izazivanju mortaliteta ličinki kestenjastog brašnara u odnosu na odrasli stadij, te je povoljnija temperatura okoline od 22 °C na njihovu patogenost, u odnosu na 15 °C.

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Majić

Broj stranica: 38

Broj slika: 17

Broj tablica: 4

Broj literaturnih navoda: 55

Broj priloga: -

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: entomopatogene nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Tribolium castaneum*, suzbijanje, mortalitet

Datum obrane: 27.9.2018.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Anita Liška, predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Ivana Majić, mentor
3. doc. dr. sc. Ankica Sarajlić, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, Sveučilišta u Osijeku, Vladimira Preloga 1, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
University Graduate Studies, Plant production course Plant Protection

Graduate thesis

Efficacy of entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditis bacteriophora*) in control of the red flour beetle (*Tribolium castaneum*)

Petra Mazur

Abstract: The paper describes laboratory testing of the activity of entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* in control of larvae and adults of the red flour beetle *Tribolium castaneum*. The highest mortality of *T. castaneum* larvae was achieved with the highest concentration of nematodes (1000 IJ/1 insect larvae) already the second day after the experiment was set up. On the mortality of adults the highest mortality was achieved in treatment with 100 IJ/1 insect adult. This study proved that entomopathogenic nematodes *H. bacteriophora* are pathogenic to *T. castaneum*. Pathogenicity of *H. bacteriophora* was higher in warmer environment (22 °C) and it was affected by the temperature in this experiment.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Mentor: PhD Ivana Majić, associate professor

Number of pages: 38

Number of figures: 17

Number of tables: 4

Number of references: 55

Number of appendices: -

Original in: Croatian

Key words: nematodes, entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Tribolium castaneum*, control, mortality

Thesis defended on date: 27.9.2018.

Reviewers:

1. PhD Anita Liška, associate professor
2. PhD Ivana Majić, associate professor
3. PhD Ankica Sarajlić, assistant professor

Thesis deposited at: Library Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1, Osijek